

AUS DER MEDIZINISCHEN UNIVERSITÄTSKLINIK ZÜRICH

Direktor: Prof. Dr. med. W. Löffler

Arbeit unter Leitung von P.-D. Dr. med. F. Koller

Ein Beitrag zur Genese der idiopathischen Thrombopenie

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung der Doktorwürde
der Medizinischen Fakultät
der Universität Zürich

vorgelegt von

Paul Flückiger

von Rohrbach (Kt. Bern)

Genehmigt auf Antrag von Prof. Dr. W. Löffler und P.-D. Dr. F. Koller

Zürich 1953
Buchdruckerei Fluntern
Plattenstrasse 27

AUS DER MEDIZINISCHEN UNIVERSITÄTSKLINIK ZÜRICH

Direktor: Prof. Dr. med. W. Löffler

Arbeit unter Leitung von P.-D. Dr. med. F. Koller

Ein Beitrag zur Genese der idiopathischen Thrombopenie

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung der Doktorwürde
der Medizinischen Fakultät
der Universität Zürich

vorgelegt von

Paul Flückiger

von Rohrbach (Kt. Bern)

Genehmigt auf Antrag von Prof. Dr. W. Löffler und P.-D. Dr. F. Koller

Zürich 1953
Buchdruckerei Fluntern
Plattenstrasse 27



1. UEBERBLICK

Gegen Ende des letzten Jahrhunderts gelang es Denys (9, 10) und Hayem (15) die Thrombopenie als Ursache bestimmter Blutungsleiden nachzuweisen. Unter dem Begriff der chronisch idiopathischen Thrombopenie fasste man in der Folge jene Plättchenmangelzustände zusammen, deren Ursache nicht genauer gefasst werden konnte. Klinisch werden diese Fälle gekennzeichnet durch eine starke Blutungstendenz, die meist schon in der Kindheit oder in der Pubertät manifest wird. Nach geringfügigen Traumen können grosse Blutungen in die Haut oder unter die Haut auftreten. Leichte Verletzungen bluten oft lange nach. Dazwischen können jedoch grössere Zeiträume liegen, in denen der Patient vollkommen beschwerdefrei ist und die Thrombocytenzahl normale Werte erreicht.

Schon früh bemühte man sich, die Genese der idiopathischen Thrombopenie genauer abzuklären. Prinzipiell sind drei verschiedene Entstehungsmechanismen denkbar:

1. Verminderte Plättchenproduktion,
2. Pathologisch vermehrter Abbau normaler Plättchen,
3. Schädigung der Plättchen in der peripheren Blutbahn.

Jede dieser Möglichkeiten ist schon ausgiebig diskutiert worden. Es wurden die entsprechenden Untersuchungen unternommen, wobei die erhaltenen Resultate oft sowohl zu Gunsten der einen wie der anderen Theorie verwendet werden konnten. Frank machte erstmals auf den typischen Befund des Sternalmarks bei der chronisch idiopathischen Thrombopenie aufmerksam (13). Man findet häufig, wenn auch nicht regelmässig, eine Vermehrung der Megakaryocyten (34) mit Vorwiegen der unreifen bis mittelreifen Formen (17, 26a). Diese Knochenmarksveränderungen können als eine Reifungsstörung aufgefasst werden.

Ungeklärt bleibt durch diese Hypothese das häufige Vorkommen einer Splenomegalie beim diskutierten Krankheitsbild. Kaznelson stellte erstmals fest, dass durch Milzexstirpation in vielen Fällen eine Dauerheilung erzielt werden konnte und versuchte dies dadurch zu erklären,

dass er eine vermehrte «thrombolytische» Tätigkeit der Milz annahm (19). Frank dagegen vermutete entsprechend seiner Vorstellung von der Genese der Thrombopenie eher eine hemmende Wirkung der vergrösserten Milz auf das Knochenmark.

Diesen beiden «klassischen» Erklärungsversuchen gegenüber gewinnen in neuerer Zeit die Beobachtungen über eine Schädigung der Thrombocyten in der peripheren Blutbahn an Interesse. Harrington transfundierte gesunden Versuchspersonen eine grössere Menge von thrombocytopenischem Blut und konnte dadurch eine Thrombopenie erzeugen, die sich erst nach einigen Tagen normalisierte (14). Da die normale Lebensdauer der Thrombocyten ca. 4—6 Tage beträgt (18), kann angenommen werden, dass durch einen Stoff im transfundierten Blut die eigenen Thrombocyten des Empfängers endgültig aus dem Kreislauf eliminiert wurden. Der Plättchen zerstörende Faktor scheint auch die Plazentarwand passieren zu können, da Neugeborene von Müttern mit idiopathischer Thrombopenie selbst stark erniedrigte Thrombocytenwerte zeigten, die sich jedoch im Laufe der ersten Lebenswochen normalisierten (33, 11a). Damit erhebt sich aber auch die Frage nach der Natur dieses thrombocytopenischen Faktors. Noch in neuerer Zeit wurde die Möglichkeit diskutiert, die Milz könne einen thrombocytopenischen Faktor produzieren (31).

Da aber andere Autoren die der Hypothese zugrunde liegenden Untersuchungsergebnisse nicht durchwegs bestätigen konnten (30, 25), muss andererseits doch auch die Möglichkeit einer allergischen Genese ins Auge gefasst werden, wie sie auch für die erworbenen hämolytischen Anämien teilweise angenommen wird. Für die Sedormidpurpura gelang es Ackroyd, den eindeutigen Nachweis einer Antikörperbildung gegen mit Sedormid beladene Thrombocyten zu erbringen (1). Ueber Plättchenagglutinine bei einer Thrombopenie nach Chinidin berichten Bigelow und Desforges (4).

Es ist jedoch das Verdienst von Evans, erstmals darauf hingewiesen zu haben, dass auch bei den idiopathischen Thrombopenien mit der Möglichkeit der Antikörperbildung gerechnet werden muss (11). Er konnte nämlich feststellen, dass sich idiopathische Thrombopenien häufig vergesellschaftet finden mit hämolytischen Anämien, die einen positiven Coombstest zeigen, bei denen also die Anämie durch Erythrocytenantikörper bedingt ist und ein ähnlicher Mechanismus für die Thrombopenie vermutet werden muss. Die Hypothese einer Schädigung der Thrombocyten im strömenden Blut widerspricht nicht den typischen Milzbefunden

und Knochenmarksveränderungen. In Analogie zu den Verhältnissen bei den hämolytischen Anämien können wir annehmen, dass mit Antikörpern beladene und vielleicht auch agglutinierte Thrombocyten sehr fragil sind und daher in der Milz dem vermehrten Abbau verfallen. Es kommt dadurch gewissermassen zu einer Art Arbeitshypertrophie der Milz, was klinisch als Splenomegalie imponiert.

Dem gesteigerten Zerfall der Thrombocyten entspricht auf der anderen Seite eine reaktive Hyperfunktion der plättchenbildenden Elemente. Tatsächlich findet man häufig eine Vermehrung der Megakaryocyten und, entsprechend einer beschleunigten Ausschwemmung, ein Vorwiegen der unreifen bis mittelreifen Formen (13, 17, 24). Aber auch das gelegentliche Auftreten pathologischer Megakaryocytenformen braucht unsere Hypothese nicht zu widersprechen, wenn wir annehmen, dass spezifisch gegen Thrombocyten gerichtete Antikörper auch an den Megakaryocyten angreifen, da diese dieselben spezifischen Gruppen enthalten werden wie ihre Abkömmlinge, worauf jüngst Sprague et al. hingewiesen haben (27).

Besteht die Hypothese eines zirkulierenden Antikörpers zu Recht, so sollte es auch möglich sein, sie durch in vitro Versuche zu bestätigen.

Schon mehrfach wurde über den Nachweis von Agglutininen im Serum von Thrombopenie-Patienten referiert. Evans fand in einigen Fällen ein Agglutinin, das die Plättchen bei einer Inkubation von 1 Std. bei 37° und darauffolgend 12 Std. bei 4° agglutinierte (11). Seine Angaben wurden von Miescher et al. bestätigt (23).

Dausset et al. berichten über einen Fall von akuter Thrombopenie, dessen Serum normale Plättchen innert 5 Min. agglutinierte (8). Stefani beobachtete ebenfalls eine Plättchenagglutination im Serum von Thrombopenie-Patienten (28).

Angesichts dieses mehrfachen Nachweises von Plättchenagglutininen bei Thrombopenien interessierte uns vor allem, ob eventuell auch inkomplette Antikörper gegen Thrombocyten zu finden seien. Um diese Frage zu klären, wandten wir den Antikörpernachweis mit Antiglobulinserum nach Coombs auf die Thrombocyten an.

2. BEMERKUNGEN ZU NORMALEN AGGLUTINATION DER THROMBOCYTEN

Im Gegensatz zu den Erythrocyten ist die Spontanagglutinationstendenz der Thrombocyten sehr gross, besteht doch ihre physiologische Aufgabe im normalen Gerinnungsmechanismus u. a. darin, durch Zusammenballung den Grundstock zur Thrombusbildung zu schaffen. Um daher die pathologische Agglutination von dieser physiologischen unterscheiden zu können, muss man sich über die Bedingungen im klaren sein, welche die normale Agglutination herbeiführen können. Wir wollen darum nachfolgend kurz auf die einzelnen Faktoren eingehen, die für die Plättchenagglutination eine Rolle spielen.

Plättchen agglutinieren leicht bei Kontakt mit fremden Oberflächen. Die Oberflächenwirkung kann weitgehend, jedoch nicht vollständig aufgehoben werden, wenn wir die Oberfläche unbenetzbar machen, indem wir sie mit einem feinen Paraffin- oder Silikonfilm überziehen.

Für in vitro Versuche mit Thrombocyten ist in diesem Zusammenhang noch besonders darauf hinzuweisen, dass auch Verunreinigungen der verwendeten Suspensionen, z. B. mit ubiquitären Mikroorganismen zu einem Agglutinationszentrum für Thrombocyten werden können. Ueberdies scheinen gewisse Saprophyten an sich agglutinationsfördernde Stoffe zu produzieren, wie uns eigene Untersuchungen zeigten. Ähnliche Verhältnisse sind für die Erythrocyten schon lange bekannt.

Es erhebt sich natürlich auch die Frage, inwiefern die Gerinnungsfaktoren für die Thrombocytenagglutination eine Rolle spielen. Mehrfach ist schon darauf hingewiesen worden, dass Thrombin, dem im Gerinnungsvorgang eine zentrale Stellung zukommt, eine agglutinationsfördernde Wirkung ausüben soll (26). Wir versuchten, dies experimentell nachzuweisen. Dabei konnten wir im Phasenkontrastmikroskop beobachten, dass Zusatz einer Thrombinlösung zu einer Thrombocytensuspension in physiologischer Kochsalzlösung verstärkte Pseudopodienbildung auslöste. Ueber ähnliche Beobachtungen berichtete schon früher Fonio (12). Jedoch konnte im Serum, dem Thrombin und Plättchen zugegeben wurde, keine wesentliche Agglutination beobachtet werden (35). Zusatz von Spuren

von Thrombin (0,2 mg⁰/₀) zu plättchenhaltigem Plasma führt dagegen zu starker Agglutination, entsprechend dem langsamen Eintritt des Gerinnungsprozesses, der damit ausgelöst wird.

Zusammenfassend können wir daher sagen, dass Thrombin wohl einen labilisierenden Effekt auf die Thrombocyten ausübt. Doch kann damit ein wesentliches Mitwirken anderer Pläsmafaktoren bei der Agglutination nicht ausgeschlossen werden.

Stefanini wies eine Abhängigkeit der agglutinationsauslösenden Eigenschaften des Serums vom Prothrombingehalt nach. Ist der Prothrombinspiegel pathologisch erhöht, was bei Thrombopenien nicht selten der Fall ist, so leitet Thrombocytenzusatz zum Serum erneut die erste Gerinnungsphase ein, wobei die Thrombocyten agglutinieren. Durch Vorbehandlung des Serums mit Tricalciumphosphatgel, das u. a. Prothrombin adsorbiert, werden die agglutinationsauslösenden Eigenschaften des Serums stark vermindert. In eigenen Untersuchungen konnten wir diese Angaben bestätigen.

Schliesslich ist es sehr wichtig, welche Zusätze zum thrombocytenhaltigen Plasma gemacht werden.

Isotonische Natriumcitratlösung hemmt die agglutinierende Wirkung von Plasma und Serum, wie nachfolgende einfache Versuchsanordnung zeigt:

Je 0,5 cc plättchenhaltiges Oxalatplasma werden in 4 silikonisierte Zentrifugenröhrchen gegeben.

In Röhrchen 1 geben wir keinen Zusatz.

In Röhrchen 2 Zusatz von 0,5 cc physiol. Kochsalzlösung.

In Röhrchen 3 Zusatz von 0,25 cc physiol. Kochsalzlösung und 0,25 cc Natriumcitratlösung.

In Röhrchen 4 Zusatz von 0,5 ccm Citratlösung.

Alle Röhrchen werden bei 2000 t/Min. während 5 Min. zentrifugiert. Nachher wird das Sediment leicht aufgeschüttelt und makroskopisch die Agglutination bestimmt.

In den Röhrchen 1 und 2 haben die Thrombocyten sich zu deutlich sichtbaren Haufen irreversibel agglutiniert, während sich in den Citratlösung enthaltenden Röhrchen 3 und 4 das Sediment wieder homogen aufschwemmen lässt.

Zusatz von physiologischer Kochsalzlösung scheint die Agglutination unbeeinflusst zu lassen.

Wir fassen alle oben erwähnten Resultate nochmals zusammen, indem wir nachfolgend die Bedingungen aufstellen, die zu beachten sind, wenn man eine pathologische Agglutination von der normalen abgrenzen will.

1. Die Trennung der Thrombocyten vom übrigen Blut soll in der Kälte erfolgen, um jeden Gerinnungsprozess hinten zu halten.
2. Die verwendeten Seren resp. Plasmen müssen von Microorganismen und anderen Verunreinigungen frei sein.
3. Als Zusatz zu Seren resp. Plasmen müssen immer dieselben Lösungen verwendet werden (je nach Verwendungszweck Kochsalz- oder Citratlösung).
4. Das Anlegen mehrerer Kontrollen ist unerlässlich, da die normale Agglutinationsbereitschaft von Patient zu Patient und beim gleichen Patient zu verschiedenen Zeitpunkten oft nicht unerheblich schwankt.

3. PRÜFUNG DER AGGLUTINATION IM DIREKTEN COOMBSTEST

Die Methode wurde 1945 erstmals von Coombs angewendet zum Nachweis inkompletter Antikörper an Erythrocyten bei Rhesusincompatibilitäten (5, 6, 7). In der Folge gelang es nicht nur blutgruppenspezifische, sondern auch unspezifische Autoantikörper bei gewissen Formen von hämolytischen Anämien mit dem Antiglobulinserum nachzuweisen.

Das Prinzip der Methode auf die Thrombocyten angewendet besteht darin, dass man die Thrombocyten durch mehrmaliges Auswaschen in globulinfreier Suspension erhält. Spezifisch gegen die Thrombocyten gerichtete Globuline bleiben jedoch dabei an der Plättchenoberfläche haften. Gibt man zu diesen mit Globulinen beladenen Thrombocyten ein Antiglobulinserum, so erfolgt eine Agglutination der Plättchen.

Methodik

a) Herstellung der Antiglobulinseren

Als Antigen wird menschliches, aus mehreren Blutproben der Blutgruppe 0 gemischtes, seitzfiltriertes Vollserum verwendet. Von diesem wird einem Kaninchen 0,5 cc in die Ohrvene injiziert. Am 2., 4., 6., 8. und 10. Tag wird die Injektion wiederholt. Nach 5 Tagen Ruhe werden aus der Ohrvene einige cc Blut entnommen und Probepraecipitationen durchgeführt. Liegt der Praecipitationstiter ausgewertet gegen eine Verdünnungsreihe des Mischserums bei Verwendung von konzentriertem Kaninchenserum unter 1 : 10'000, wird das ganze oben beschriebene Vorgehen wiederholt. Ist der Titer dann noch immer ungenügend, so muss eine dritte Injektionsserie angeschlossen werden. Doch wird bei Wiederholung die erste Injektion der Serie zur Verhütung eines anaphylaktischen Schocks subcutan und nicht intravenös verabfolgt.

Ist der Titer ausreichend, werden durch eine Herzpunktion ca. 40 cc Blut entnommen und anschliessend dem Tier 40 cc 0,9% Kochsalzlösung eingespritzt. Die Tiere können mehrfach verwendet werden. Grössere Blutentnahmen sollten aber nicht häufiger als alle 2 Monate vorgenommen werden.

Das vom Blutkuchen abgetrennte Kaninchenserum wird $\frac{1}{2}$ Std. bei 56° C inaktiviert und dann während 3—5 Min. mit gleichen Teilen eines Sedimentes von 8 mal mit reichlich Kochsalzlösung globulinfrei gewaschenen Erythrocyten der Gruppen A, B und 0 adsorbiert, um die im Kaninchenserum vorhandenen artspezifischen Agglutinine gegen menschliche Erythrocyten zu entfernen. Eventuell müssen diese Absorptionen mehrfach wiederholt werden.

Das Serum wird darauf ohne Zusatz von Desinfizienten und ohne Entkeimungsfiltration bei -20° C gefroren aufbewahrt.

b) Herstellung einer Thrombocytensuspension

Mit einer silikonisierten Flügelnadel werden aus der Cubitalvene je 9 cc Blut in 2—3 vorgekühlte Zentrifugenröhrchen entnommen, die je 1 cc Natriumoxalat $\frac{1}{10}$ mol enthalten. Der Inhalt der Röhrchen wird gut durchmischt und sofort bei 4° C mit 3000 t/Min. während 25 Min. zentrifugiert. Dabei werden die Thrombocyten in dünner Schicht auf die Erythrocyten sedimentiert. Das überstehende plättchenfreie Plasma wird bis auf die Thrombocytenschicht abpipettiert. Die Thrombocytenschicht wird in ein silikonisiertes Röhrchen abgesaugt und dieses aufgefüllt mit eisgekühlter isotonischer Natriumcitratlösung. Nach gutem Durchmischen des Inhaltes wird das Röhrchen 15 Min. bei 3000 t/Min. zentrifugiert. Dabei erhalten wir eine kleine Schicht restlicher Erythrocyten und darauf eine dicke Schicht Thrombocyten, welche wieder abgesaugt und nun — da der grösste Teil des agglutinationsauslösenden Plasmas entfernt ist — mit 0.9% Kochsalzlösung aufgeschwemmt wird. Jetzt wird 4 Min. bei 1800 t/Min. zentrifugiert. Dabei werden die Erythrocyten und Leukocyten sedimentiert, während die Thrombocyten suspendiert bleiben. Diese Thrombocytensuspension wird abgehebert und bei 3000 t/Min. während 10 Min. die Plättchen aus zentrifugiert. Das Sediment wird wieder mit physiologischer Kochsalzlösung aufgeschwemmt. Auf diese Weise werden die Plättchen dreimal ausgewaschen.

Zuletzt setzt man dem Thrombocytensediment nur ganz wenig Kochsalzlösung zu, sodass eine sehr dichte Plättchenaufschwemmung entsteht. Diese wird etwa 1 Stunde bei Zimmertemperatur stehen gelassen. In dieser Zeit setzen sich die wenigen Agglutinate, die sich beim Auswaschen gebildet haben, am Boden des Röhrchens ab. Mit der überstehenden Suspension kann nun der Coombstest durchgeführt werden.

c) Ausführung der Agglutinationsproben

In kleinen Röhrchen von 50 auf 5 mm legt man eine Verdünnungsreihe des Antiglobulinserums mit physiologischer Kochsalzlösung an. Von diesen Verdünnungen gibt man je einen Tropfen auf einen sorgfältig gereinigten Objektträger. Dann fügt man jeder Probe einen kleinen Tropfen der auf oben beschriebene Weise erhaltenen Thrombocyten suspension zu und vermischt mit einem Glasstab die beiden Tropfen. Nach etwa 10 Min. bestimmt man die Agglutination. Die Ablesung erfolgt im Phasenmikroskop.*) Als positive Agglutinationsproben werden jene Fälle bewertet, bei denen ca. $\frac{3}{4}$ der Thrombocyten agglutiniert sind. Fraglich positive Reaktionen ($\pm$) wurden angenommen, wenn sich nur kleine Agglutinate von wenigen Thrombocyten bildeten. Das Resultat der Agglutinationsproben kann in den meisten Fällen schon makroskopisch eindeutig beurteilt werden.

d) Mögliche Fehlerquellen bei der Bestimmung der Agglutination

1. Bei Verwendung sehr kleiner Tropfen kann durch Austrocknung der Präparate eine leichte, nur mikroskopisch fassbare Agglutination entstehen, die aber gelegentlich doch zu falschen positiven Resultaten führen könnte.

2. Gelegentlich gibt es Coombs-Seren, die auch mit normalen Thrombocyten leichte Agglutinationen ergeben (siehe unten). Mit jedem neu hergestellten Antiglobulinserum sind daher Kontrollen mit normalen Thrombocyten durchzuführen. Ferner empfiehlt es sich, bei jeder Bestimmung eine Kontrolle mit normalen Thrombocyten mitlaufen zu lassen.

3. Die verwendeten Plättchensuspensionen müssen frisch hergestellt sein, um falsche negative Resultate zu vermeiden.

U n t e r s u c h t e F ä l l e

Mit der beschriebenen Methodik untersuchten wir 5 Fälle von idiopathischer Thrombopenie. In weiteren 5 Fällen konnte der Test nicht angewendet werden, da die Thrombocytenwerte weniger als 25'000/cmm betrugen. Wenn die Thrombocytenwerte diese Grenze unterschritten, gelang es uns auch bei Verwendung grösserer Blutmengen nicht mehr genügend Plättchen zu isolieren, um einen einwandfreien Antiglobulintest

*) Das Phasenmikroskop wurde uns in verdankenswerter Weise von der Firma Wild AG, Heerbrugg, zur Verfügung gestellt.

durchzuführen. Als Kontrollen dienten uns 27 Personen mit normalen Thrombocytenwerten: es handelte sich teils um gesunde Versuchspersonen, teils um Patienten mit Krankheiten, die in keinem Zusammenhang mit der Blutgerinnung standen.

Da uns im Rahmen dieser Arbeit besonders die idiopathischen Thrombopenien interessieren, geben wir nachfolgend einen kurzen Auszug aus den Krankengeschichten der 5 Fälle, bei denen der Test durchgeführt werden konnte.

Kasuistik

Fall 1: S. C. 36-j., ♀ In der Familie sind keine Blutungsleiden nachweisbar und auch die 4 Kinder der Patientin sind gesund. Nachdem die Patientin früher immer beschwerdefrei war, traten vor 5 Jahren erstmals gelegentlich blaue Flecken auf der Haut auf. Vor 3 Jahren wurde eine Thrombopenie festgestellt und eine Sternalpunktion vorgenommen, welche eine leichte Vermehrung der Megakaryocyten ergab mit Vorwiegen der jüngeren Formen. Die Hautblutungen wurden seither eher häufiger. Die Thrombocytenwerte bewegten sich in diesen Jahren, in denen die Patientin in ärztlicher Kontrolle stand, zwischen 10 000 und 100 000 Thrombocyten/cmm. Der direkte Coombs-Test der Erythrocyten war negativ.

Fall 2: A. M. 45-j., ♂ In der Familie des Patienten finden sich keine Blutungsleiden. Vor 9 Jahren wurde beim Patienten erstmals eine Thrombopenie festgestellt. Bei längerem Stehen bildeten sich an den Unterschenkeln des Patienten beträchtliche Suffusionen. Die Blutungserscheinungen wurden dann mehrmals so stark, dass der Patient hospitalisiert werden musste. Es wurde deshalb vor 5 Jahren die Milzexstirpation vorgenommen. Die hämorrhagischen Erscheinungen sind seither verschwunden, doch schwankten die Thrombocytenzahlen auffällig stark zwischen ganz niedrigen und normalen Werten. Der direkte Erythrocyten-Coombstest war negativ.

Fall 3: R. B. 37-j., ♀ Der Vater der Patientin starb an einer infizierten Cystenleber. Vor 4 Jahren konnte erstmals eine Thrombopenie als Ursache einer hämorrhagischen Diathese festgestellt werden. Der Arzt fand damals eine Hepatosplenomegalie. Bald darauf traten wechselnde neurologische Symptome auf, die als Hämatomyelie gedeutet wurden. Im Zeitpunkt der Untersuchung hatte die Patientin eben wieder einen Apoplexie-ähnlichen Insult mit vorübergehender Lähmung der rechten Hand durchgemacht. Der direkte Erythrocyten-Coombstest war positiv bis zu einer Antiglobulinserumverdünnung von 1 : 8000. Der indirekte Coombstest war bei 220 C positiv bis 1 : 32 und bei 370 C positiv bis 1 : 128.

Fall 4: A. H. 24-j., ♀ In der Familienanamnese sind keine Blutungsleiden nachweisbar. Schon als Kleinkind hatte die Patientin häufig blaue Flecken auf der Haut und litt unter häufigem Nasenbluten. Die Menses waren seit der Menarche immer sehr stark. Die Thrombocytenzahl schwankte zwischen 20 000 und 50 000/cmm.

Im Zeitpunkt der Untersuchung betrug die Thrombocytenzahl 30 000. Der direkte Erythrocyten-Coombstest war negativ.

Fall 5: H. L. 27-j. ♀ In der Ascendenz der Patientin lassen sich keine Blutungsleiden nachweisen. Im 21. Altersjahr trat erstmals im Anschluss an eine Angina eine extreme Thrombopenie auf mit petechialen Blutungen über der ganzen Haut. Die hämorrhagischen Erscheinungen hielten in den folgenden Jahren ohne Unterbruch an und die Thrombocytenzahl blieb dauernd sehr niedrig. Es wurde deshalb vor 2 Jahren die Splenektomie durchgeführt. Seither ist die Patientin beschwerdefrei und die Thrombocytenzahlen sind immer normal bis leicht erhöht. Der Erythrocyten-Coombstest war negativ.

Resultate

Alle Fälle wurden mit zwei verschiedenen Coombsseren untersucht und die Ergebnisse bei den idiopathischen Thrombopenien an verschiedenen Tagen nachkontrolliert.

In allen 27 Kontrollfällen fanden wir entweder keine Agglutination oder, mit anderen Seren, höchstens bis in die Serumverdünnung 1 : 2. Die Resultate bei den idiopathischen Thrombopenien mit einem bestimmten Coombsserum ergeben sich aus untenstehender Tabelle.

Coombsserum- Verdünnung	1:1	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128
Fall 1 S. C.	+	+	+	+	+	+	±	—
Fall 2 A. M.	+	+	+	+	+	±	—	—
Fall 3 R. B.	+	+	+	+	+	±	—	—
Fall 4 A. H.	+	±	—	—	—	—	—	—
Fall 5 H. L.	±	—	—	—	—	—	—	—

In den Fällen 1, 2 und 3 finden wir einen signifikanten Titerunterschied von mindestens 4 Titerstufen gegenüber den Kontrollfällen. Die leichte Agglutination im konzentrierten Antiglobulinserum ist wahrscheinlich darauf zurückzuführen, dass sich in den menschlichen Seren, mit denen die Kaninchen immunisiert werden, noch Spuren von Thrombocyten-spezifischen Substanzen fanden, gegen welche Antikörper gebildet werden. Dass Thrombocyten-agglutinierende Antikörper durch Sensibilisierung von Kaninchen resp. Meerschweinchen erhalten werden, ist ja schon lange bekannt (21, 22, 3). In den Fällen 4 und 5 fanden wir mit einigen Seren leichte Agglutination im konzentrierten Serum, die sich jedoch nicht von den Kontrollen unterschied.

4. DISKUSSION

Auffallend ist vor allem die Tatsache, dass sich unter den Patienten mit idiopathischer Thrombopenie Fälle mit einem positiven Antiglobulintest fanden. Mit Thrombocyten von Gesunden oder von Patienten mit einem Leiden, das die Blutgerinnung intakt lässt, konnte in keinem Fall abnorme Agglutination beobachtet werden. Es ist jedoch nicht so, dass die Plättchen jeder Thrombopenie im Antiglobulinserum agglutinieren (vergl. Fall 4 und 5). Wenn aber sowohl Thrombopeniefälle mit positivem als auch solche mit negativem Coombstest vorkommen, so erhebt sich sogleich die Frage, ob sich diese beiden Formen eventuell auch klinisch unterscheiden lassen.

Die Zahl der untersuchten Fälle ist noch zu klein, um etwas Sicheres über den Zusammenhang zwischen Ausfall unserer Agglutinationsproben und klinischem Bild aussagen zu können. Doch geben uns die erhaltenen Resultate immerhin zu einigen Vermutungen Anlass.

Bei den drei positiven Fällen wurde die Thrombopenie erstmals zwischen dem 25. und dem 35. Altersjahr manifest. Bei unseren beiden Fällen 4 und 5 mit negativem Coombstest traten die ersten Symptome im Kleinkinderalter, resp. nach der Pubertät auf. Wichtiger als dieser Unterschied im Alter der Manifestation scheint uns die Verlaufsform der Thrombopenie zu sein. Bei unseren positiven Fällen fallen die starken Schwankungen der Thrombocytenzahlen zwischen beinahe normalen und sehr niedrigen Werten auf, während bei den negativen Fällen die Thrombocytenzahl konstant auf niedrigen Werten bleibt.

Es ist aber auch interessant, den Erfolg der Milzexstirpation in unseren beiden Gruppen zu vergleichen. Einmal ist festzuhalten, dass noch Jahre nach einer Splenektomie ein positiver Thrombocyten-Coombstest gefunden werden kann, wie unser Fall 2 zeigt. Dies ist deshalb bemerkenswert, wenn man berücksichtigt, dass die Milz als Antikörperbildner gilt (32). Trotz klinischer Heilung schwankten aber die Thrombocytenzahlen stark zwischen normalen und sehr erniedrigten Werten. Fall 5 dagegen, der einen negativen Coombstest zeigt, ergab bei den Kontrollen nach der Splenektomie dauernd hohe Thrombocytenwerte.

Es scheint demnach ein gewisser Zusammenhang zwischen der Form der Thrombopenie und dem Ausfall des Antiglobulintestes zu bestehen, indem vor allem jene Formen einen positiven Coombstest ergeben, welche Spontanremissionen zeigen. Letztere wurden auch schon als akute Form des Werlhof der chronischen Form ohne Remissionen gegenübergestellt (16).

Welche Bedeutung ist nun überhaupt dieser Thrombocytenagglutination durch das Coombsserum beizumessen? Um diese Frage zu klären, scheint uns ein Hinweis auf den Fall 3 wertvoll zu sein. Hier finden wir nämlich gleichzeitig einen extrem hohen Titer an Autoantikörpern gegen Erythrocyten. Es ist daher naheliegend anzunehmen, dass in analoger Weise auch Antikörper gegen Thrombocyten vorhanden sind, welche den positiven Coombstest ergeben. Wir möchten hier nochmals die Arbeit von Evans et al. in Erinnerung rufen (11). Evans fand mehrmals ein gleichzeitiges Auftreten einer hämolytischen Anämie mit positivem Coombstest zusammen mit einer idiopathischen Thrombopenie und schloss daraus auf einen ähnlichen oder gar gemeinsamen pathogenetischen Mechanismus. Ursache der Thrombopeniefälle mit positivem Coombstest wäre demnach eine Autosensibilisierung gegen die eigenen Thrombocyten. Allerdings können wir ebensowenig erklären, warum es zu dieser Immunisierung gegen körpereigene Zellen kommt, als das in den meisten Fällen von erworbener hämolytischer Anämie möglich ist.

Dagegen liegt den Fällen mit negativem Antiglobulintest, die klinisch dem «chronischen» Werlhof entsprechen, möglicherweise eine andere Pathogenese zu Grunde. Wir müssen einmal an die Möglichkeit eines anderen immunologischen Vorganges denken, der nicht zur Bildung von inkompletten Antikörpern führt, sondern z. B. sich durch komplette Agglutinine manifestiert. Solche sind schon mehrfach beschrieben worden, sie konnten aber nur bei einem Teil der Fälle von idiopathischer Thrombopenie nachgewiesen werden. In keinem Serum der 5 von uns untersuchten Fälle gelang es uns, ein pathologisches Agglutinin nachzuweisen. Die Fälle mit kompletten und jene mit inkompletten Antikörpern stellen möglicherweise zwei verschiedene Gruppen dar.

Schliesslich bestehen aber sicher auch die älteren Theorien für einen Teil der Fälle zu Recht, die eine primäre Knochenmarksreifungsstörung oder eine splenomegale Markhemmung annehmen. Vielleicht ist unser Fall 4 in diese Gruppe einzureihen, da die ersten Krankheitserscheinungen in der frühen Kindheit auftraten.

Wollen wir aus der Fülle des angesammelten Beobachtungsmaterials und der Hypothesen das einigermaßen gesicherte Wissen herausgreifen, so können wir sagen, dass pathogenetisch gesehen nicht eine einheitliche idiopathische Thrombopenie existiert, sondern dass unter diesem Begriff verschiedene Krankheiten eingeschlossen sind, die das eine Symptom des mehr oder weniger chronischen Plättchenmangels gemeinsam haben. Es wird eine wichtige Aufgabe der Zukunft sein, aus diesem Sammeltopf die einzelnen Krankheitsbilder herauszukristallisieren. Ein wesentlicher Schritt in dieser Richtung scheint uns die weitere konsequente Anwendung des Antiglobulintestes auf die Thrombocyten zu sein.

ZUSAMMENFASSUNG

Es wird ein Ueberblick gegeben über die heutigen Vorstellungen von der Genese der idiopathischen Thrombopenie. Ausgehend von der Möglichkeit, dass wenigstens ein Teil der Thrombopenien durch Autoantikörperbildung verursacht sei, wurde die Agglutination der Thrombocyten von idiopathischen Thrombopenien im Coombsserum geprüft. Die Durchführung der Proben in 5 Fällen nach der geschilderten Methodik ergab in 3 Fällen eine signifikante positive Reaktion gegenüber 27 Kontrollfällen, bei denen keine Agglutination auftrat.

Die Bedeutung dieser Resultate wird diskutiert.

LITERATURVERZEICHNIS

1. Ackroyd J. F., Progress in allergy, S. Karger, Basel 1952.
2. Adelson E., Stefanini M., Demonstration and characterization of a heterologous (Forssman) platelet agglutinin. *Blood* 7, 700, 1952.
3. Bedson S. P., Blood platelet, anti-serum. *J. Bath. Bact.* 25, 94, 1922.
4. Bigelow F. S., Desforbes J. F., Platelet agglutination by an abnormal plasma factor in thrombocytopenic purpura associated with quinidine ingestion. *Amer. J. med. Sci.* 224, 274, 1952.
5. Coombs R. R. A., Mourant A. E., Race R. R., A new test for the detection of weak and incomplete Rh-agglutinins. *Brit. J. exp. Path.* 26, 255, 1945.
6. Coombs R. R. A., Mourant A. E., Race R. R., Detection of weak and incomplete Rh-agglutinins: a new test, *Lancet* 2, 15, 1945.
7. Coombs R. R. A., Mourant A. E., On certain properties of antisera prepared against human serum and its various protein fractions. *J. Path. Bact.* 59, 105, 1947.
8. Dausset J., Delafontaine P., Fleuriot Y., Agglutination et destruction «in vitro» des plaquettes normales par le sérum d'une malade atteinte de purpura thrombopénique aigu. Inhibition par ce sérum de la retraction du caillot normal. *Sang* 5, 373, 1952.
9. Denys, La cellule. 3, 1887.
10. Denys, La cellule. 5, 1889.
11. Evans R. S., Takahashi K., Duane A. B., Payne R., Liu C., Primary thrombocytopenic purpura and acquired hemolytic anemia. Evidence for a common etiology. *Arch. intern. Med.* 87, 48, 1951.
- 11a. Epstein R. D., Lozner E. L., Cobbe T. S., Davidson C. S., Congenital thrombocytopenic purpura, purpura hemorrhagica in pregnancy and in the newborn. *Amer. J. Med.* 9, 44, 1950.
12. Fonio A., Schwendener J., Die Thrombocyten des menschlichen Blutes. H. Huber, Bern, 1942.
13. Frank E., Die hämorrhagischen Diathesen. Schittenhelms Handbuch der Krankheiten des Blutes. Bd. 2, 289, Springer Verlag Berlin, 1925.
14. Harrington W. J., Minnich V., Hollingworth J. W., Moore C. V., Demonstration of a thrombocytopenic factor in the blood of patients with thrombocytopenic purpura. *J. Lab. clin. Med.* 38, 1, 1951.
15. Hayem G., Presse méd. 3, 324, 1895.
16. Heilmeyer L., Hämorrhagische Diathesen mit Plättchenmangel. Mohr-Staehelin-Bergmann: Hdb. inn. Med. 2, 813, 1951, Springer-Verlag, Berlin.
17. Hewlett J. S., Diggs L. W., A study of the bone marrow from thirty-six patients with idiopathic hemorrhagic thrombopenic purpura. *Blood* 3, 1090, 1948.

18. Hirsch E. O., Gardner F. H., The life span of transfused human platelets. *J. clin. Invest.* 30, 649, 1951.
19. Kaznelson P., Thrombolytische Purpura. *Z. klin. Med.* 87 & 88, 1919.
20. Lawrence J. S., Valentine W. N., The blood platelets: the rate of their utilization in the cat. *Blood* 2, 40, 1947.
21. Ledingham J. C. G., Bedson S. P., Experimental purpura. *Lancet* 1, 311, 1915.
22. Ledingham J. C. P., The experimental production of purpura in animals. *Lancet* 1, 1673, 1914.
23. Miescher P., Cruchaud S., Hemmeler G., Nouvelles acquisitions concernant la pathogénèse de la thrombopénie essentielle. *Helv. med. Acta* 19, 434, 1952.
24. Presley S. J., Best W. R., Limarzi L. R., Bone marrow in idiopathic thrombocytopenic purpura. *J. Lab. clin. Med.* 40, 503, 1952.
25. Pohle F. J., Meyer O. O., Inability to demonstrate a platelet reducing substance in the acetone extract of the spleen from patients with ITP. *J. clin. Invest.* 18, 537, 1939.
26. Quick J. A., Shanberge J. M., Stefanini M., The role of platelets in the coagulation of blood. *Amer. J. med. Sci.* 217, 198, 1949.
- 26a. Rohr K., Das menschliche Knochenmark. S. 299, Thieme-Verlag, Stuttgart 1948.
27. Sprague C. C., Harrington W. J., Lange R. D., Shapleigh J. B., Platelet transfusions and the pathogenesis of idiopathic thrombocytopenic purpura. *J. amer. med. Ass.* 150, 1193, 1952.
28. Stefanini M., Chatterjea J. B., Adelson E., Immunologic aspects of idiopathic thrombocytopenic purpura. *J. clin. Invest.* 31, 665, 1952.
29. Stefanini M., Silverberg J. H., Studies on platelets. I. Relationship of platelet agglutination to the mechanism of blood coagulation. *Amer. J. clin. Path.* 21, 1030, 1951.
30. Tocantins L. M., No platelet-destroying action in extracts of the spleen and urine of patients with chronic thrombopenic purpura. *Proc. Soc. exper. Biol. Med.* 42, 485, 1939.
31. Troland C. E., Lee F. C., Thrombocytopen. *J. amer. med. Ass.* 111, 221, 1938.
32. Wagley P. F., Shen S. C., Gardner F. H., Castle W. B., The spleen as a source of a substance causing agglutination of the red blood cells of certain patients with acquired hemolytic jaundice by an antihuman serum rabbit serum. *J. Lab. clin. Med.* 33, 1197, 1948.
33. Waters H. W., Neonatal thrombocytopenic purpura. *Amer. J. Obst. a. Gynec.* 51, 708, 1946.
34. Wright J. H., The histogenesis of the blood platelets. *J. Morphol.* 21, 263, 1910.
35. Zollikofer H., cit. n. Bally P. R., Ueber die klin. Bedeutung des Heparins. *Z. klin. Med.* 148, 295, 1951.

CURRICULUM VITAE

Am 5. Oktober 1926 wurde ich in St. Gallen geboren. Dasselbst besuchte ich die Primarschule und das Gymnasium. 1945 schloss ich mit der Maturitätsprüfung ab. Das Medizinstudium absolvierte ich an der Universität Zürich mit Ausnahme eines klinischen Semesters in Basel. Im Herbst 1951 bestand ich die eidgenössische Fachprüfung in Zürich.

Herrn PD Dr. med. F. Koller möchte ich für die Ueberlassung des Themas und sein nimmermüdes Interesse an meiner Arbeit meinen besten Dank aussprechen.

Herrn Dr. med. A. Hässig, Leiter des serologischen Zentrallaboratoriums des Blutspendedienstes des Schweizerischen Roten Kreuzes in Bern, bin ich für die Ueberlassung von Coombsseren wie auch für seine Hinweise auf serologischem Gebiet zu grossem Dank verpflichtet.

Herrn Prof. Dr. med. K. Rohr, der mir die Thrombopenie-Fälle zuwies und deren Krankengeschichten überliess, bringe ich meine grosse Dankbarkeit zum Ausdruck.

Der «Fritz Hoffmann-La Roche-Stiftung», Basel, danke ich für die grosszügige materielle Unterstützung.

